



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 195 45 468 A 1**

②① Aktenzeichen: 195 45 468.5
②② Anmeldetag: 6. 12. 95
④③ Offenlegungstag: 21. 8. 97

⑤① Int. Cl.⁶:
C 12 N 15/63
C 12 N 15/80
C 12 N 15/60
C 12 N 1/00
C 12 N 1/15
C 12 P 25/00
C 07 D 475/14
// (C12N 15/60, C12R
1:645) (C12P 25/00,
C12R 1:645) A61K
31/525, A23K 1/16,
A23L 1/275, 1/24,
1/187, A23G 9/00

DE 195 45 468 A 1

⑦① Anmelder:
Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428 Jülich, DE;
BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

⑦② Erfinder:
Stahmann, Klaus-Peter, Dr., 52428 Jülich, DE;
Böddecker, Theo, 52428 Jülich, DE; Sahm, Hermann,
Prof., 52428 Jülich, DE; Seulberger, Harald, Dr.,
69221 Dossenheim, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:
EP 4 05 370 A1

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren zur Herstellung von Riboflavin mittels Mikroorganismen mit erhöhter Isocitratlyase-Aktivität

DE 195 45 468 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Riboflavin gemäß den Ansprüchen 1 bis 11, Isocitratlyasegene gemäß den Ansprüchen 12 bis 15, Genstrukturen nach Anspruch 16, Vektoren nach Anspruch 17, transformierte Zellen gemäß Anspruch 18 bis 20 sowie Verwendungen eines Isocitratlyasegens nach Anspruch 21 bis 27.

Das Vitamin B₂, auch Riboflavin genannt, ist für Mensch und Tier essentiell. Bei Vitamin-B₂-Mangel treten Entzündungen der Mund- und Rachenschleimhäute, Risse in den Mundwinkeln, Juckreiz und Entzündungen in den Hautfalten u.ä. Hautschäden, Bindehautentzündungen, verminderte Sehschärfe und Trübung der Hornhaut auf. Bei Säuglingen und Kindern können Wachstumsstillstand und Gewichtsabnahme eintreten. Das Vitamin B₂ hat daher wirtschaftliche Bedeutung insbesondere als Vitaminpräparat bei Vitaminmangel sowie als Futtermittelzusatz. Daneben wird es auch als Lebensmittelfarbstoff, beispielsweise in Mayonnaise, Eiscreme, Pudding etc., eingesetzt.

Die Herstellung von Riboflavin erfolgt entweder chemisch oder mikrobiell. Bei den chemischen Herstellungsverfahren wird das Riboflavin in der Regel in mehrstufigen Prozessen als reines Endprodukt gewonnen, bei allerdings auch relativ kostspielige Ausgangsprodukte — wie beispielsweise D-Ribose — eingesetzt werden müssen. Daher kommt die chemische Synthese des Riboflavins nur für solche Anwendungszwecke in Betracht, für die reines Riboflavin notwendig ist, wie z. B. in der Humanmedizin.

Eine Alternative zur chemischen Herstellung des Riboflavins bietet die Herstellung dieses Stoffes durch Mikroorganismen. Die mikrobielle Herstellung des Riboflavins eignet sich insbesondere für solche Fälle, in denen eine hohe Reinheit dieser Substanz nicht erforderlich ist. Dies ist beispielsweise dann der Fall, wenn das Riboflavin als Zusatz zu Futtermittelprodukten eingesetzt werden soll. In solchen Fällen hat die mikrobielle Herstellung des Riboflavins den Vorteil, daß diese Substanz in einem einstufigen Prozeß gewinnbar ist. Auch können als Ausgangsprodukte für die mikrobielle Synthese nachwachsende Rohstoffe, wie beispielsweise pflanzliche Öle, eingesetzt werden.

Die Herstellung von Riboflavin durch Fermentation von Pilzen wie *Ashbya gossypii* oder *Eremothecium ashbyii* ist bekannt (The Merck Index, Windholz et al., eds. Merck & Co., Seite 1183, 1983); aber auch Hefen, wie z. B. *Candida* oder *Saccharomyces*, und Bakterien, wie *Clostridium*, sind zur Riboflavinproduktion geeignet. Riboflavin-überproduzierende Bakterienstämme sind beispielsweise in der EP 405370 beschrieben, wobei die Stämme durch Transformation der Riboflavin-Biosynthese-Gene aus *Bacillus subtilis* erhalten wurden. Diese Prokaryonten-Gene waren aber für ein rekombinantes Riboflavin-Herstellungsverfahren mit Eukaryonten wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Ashbya gossypii* ungeeignet. Daher wurden gemäß der WO 93/03183 die für die Riboflavin-Biosynthese spezifischen Gene aus einem Eukaryonten, nämlich aus *Saccharomyces cerevisiae*, isoliert, um damit ein rekombinantes Herstellungsverfahren für Riboflavin in einem eukaryontischen Produktionsorganismus bereitzustellen. Derartige rekombinante Herstellungsverfahren haben für die Riboflavin-Produktion jedoch dann keinen oder nur begrenzten Erfolg, wenn die Bereitstellung von Substrat für die an der Riboflavin-Biosynthese spezifisch beteiligten Enzyme unzureichend ist.

Es ist Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Riboflavin zu schaffen, durch das ein erhöhter Anteil an Riboflavin gebildet wird. Es ist ferner Aufgabe der Erfindung, Stoffe bereit zu stellen, die in einem solchen Verfahren einsetzbar sind.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die Isocitratlyase-(ICL-)Aktivität und/oder die ICL-Genexpression eines Riboflavin-produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Eine erhöhte ICL-Aktivität bzw. eine erhöhte ICL-Genexpression hat überraschenderweise zur Folge, daß ein erhöhter Anteil an Riboflavin gebildet wird. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, als ca. 150 Enzyme an der Riboflavin-Biosynthese beteiligt sind und die ICL als zentrales anaplerotisches Enzym keinesfalls für die Riboflavin-Synthese spezifisch ist.

Zur Erhöhung der ICL-Aktivität wird insbesondere die endogene Aktivität eines Riboflavin-produzierenden Mikroorganismus erhöht. Eine Erhöhung der Enzymaktivität kann beispielsweise erreicht werden, indem durch Veränderung des katalytischen Zentrums ein erhöhter Substratumsatz erfolgt oder indem die Wirkung von Enzym-Inhibitoren aufgehoben wird. Auch kann eine erhöhte Enzymaktivität durch Erhöhung der Enzymsynthese, beispielsweise durch Genamplifikation oder durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzym-Biosynthese reprimieren, hervorgerufen werden. Die endogene ICL-Aktivität wird vorzugsweise durch Mutation des endogenen ICL-Gens erhöht. Derartige Mutationen können entweder nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch UV-Bestrahlung oder mutationsauslösenden Chemikalien, oder gezielt mittels gentechnologischer Methoden wie Deletion(en), Insertion(en) und/oder Nukleotid-Austausch(e).

Die ICL-Genexpression wird durch Erhöhen der ICL-Genkopienzahl und/oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die ICL-Genexpression positiv beeinflussen, erhöht. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem insbesondere die Transkriptionssignale erhöht werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA verbessert wird. Zur Erhöhung der Genkopienzahl wird das ICL-Gen in ein Genkonstrukt bzw. in einen Vektor eingebaut, der vorzugsweise das dem ICL-Gen zugeordnete regulatorische Gensequenzen enthält, insbesondere solche, die die Genexpression verstärken. Anschließend wird ein Riboflavin-produzierender Mikroorganismus, vorzugsweise *Ashbya gossypii*, mit dem das ICL-Gen enthaltende Genkonstrukt transformiert.

Das ICL-Gen wird vorzugsweise aus Mikroorganismen, insbesondere aus dem Pilz *Ashbya gossypii*, isoliert. Für die Isolierung des Gens kommen aber auch alle weiteren Organismen, deren Zellen die anaplerotische Sequenz des Glyoxylat-Cyclus und damit die Isocitratlyase enthalten, also auch Pflanzen, in Betracht. Die Isolierung des Gens kann durch homologe oder heterologe Komplementation einer im ICL-Gen defekten

Mutante oder auch durch heterologes Probing oder PCR mit heterologen Primern erfolgen. Zur Subklonierung kann das Insert des komplementierenden Plasmids anschließend durch geeignete Schnitte mit Restriktionsenzymen in der Größe minimiert werden. Nach Sequenzierung und Identifizierung des putativen Gens erfolgt eine präzise Subklonierung durch Fusions-PCR. Plasmide, die die so erhaltenen Fragmente als Insert tragen, werden in die ICL-Gen-defekte Mutante eingebracht, die auf Funktionalität des ICL-Gens getestet wird. Funktionelle Konstrukte werden schließlich zur Transformation eines Riboflavin-Produzenten eingesetzt.

Nach Isolierung und Sequenzierung sind Isocitratlyasogene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die in Tabelle 1 angegebene Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen kodieren. Allel-Variationen umfassen insbesondere funktionelle Derivate, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus entsprechenden Sequenzen erhältlich sind, wobei die ICL-Aktivität aber erhalten bleibt. Eine entsprechende Sequenz ist in Tabelle 1 von Nukleotid 1 bis 1680 angegeben.

Den Isocitratlyasogenen ist insbesondere ein Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid -375 bis -1 gemäß Tabelle 1 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz vorgeschaltet. So kann beispielsweise dem Gen ein Promotor vorgeschaltet sein, der sich von dem Promotor mit der angegebenen Nukleotidsequenz durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) unterscheidet, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit des Promotors beeinträchtigt ist. Desweiteren kann der Promotor auch durch Veränderung seiner Sequenz in seiner Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren ausgetauscht werden.

Dem ICL-Gen können desweiteren regulatorische Gensequenzen bzw. Regulatorgene zugeordnet sein, die insbesondere die ICL-Gen-Aktivität erhöhen. So können dem ICL-Gen beispielsweise sog. "enhancer" zugeordnet sein, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA eine erhöhte ICL-Genexpression bewirken.

Dem Isocitratlyasogen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne Regulatorgen können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in einer Genstruktur enthalten ist.

Durch Klonierung des ICL-Gens sind Plasmide bzw. Vektoren erhältlich, die das ICL-Gen enthalten und — wie bereits oben erwähnt — zur Transformation eines Riboflavin-Produzenten geeignet sind. Die durch Transformation erhältlichen Zellen, bei denen es sich vorzugsweise um transformierte Zellen von *Ashbya gossypii* handelt, enthalten das Gen in replizierbarer Form, d. h. in zusätzlichen Kopien auf dem Chromosom, wobei die Genkopien durch homologe Rekombination an beliebigen Stellen des Genoms integriert werden, und/oder auf einem Plasmid bzw. Vektor.

Ausführungsbeispiele

1. Erstellung einer genomischen Genbank aus *Ashbya gossypii*

Zur Erstellung einer genomischen DNA-Bank wurde chromosomale DNA nach der Methode von Wright und Philippsen (1991, *Gene* 109: 99–105) isoliert. Die DNA wurde partiell mit *Sau 3A* verdaut und mit einem Saccharose-Dichtegradienten fraktioniert. Die größten Fragmente (Fig. 1) wurden mit dem *Bam* H1 geschnittenen *E. coli*/S. cerevisiae Shuttlevektor YEp 352 (J.E. Hill et al., 1993, *Yeast* 2: 163–167) ligiert. Mit diesem Ligationsansatz wurde *E. coli* DH5 α transformiert. Von Platten mit Ampicillin und X-Gal wurden 3600 Kolonien isoliert, die durch ihre weiße Farbe als Klone mit Insert tragendem Plasmid erkennbar waren. Die Untersuchung von dreißig solcher zufällig ausgewählter Klone ergab, daß tatsächlich alle ein Plasmid trugen, diese inserts im Größenbereich 7–18 kb hatten und alle Inserts verschieden waren, was anhand der Restriktionsmuster erkennbar war. Aufgrund einer Genomgröße von 7×10^3 kb für *Ashbya gossypii* liegt die Wahrscheinlichkeit, daß jedes Gen in dieser Genbank enthalten ist bei 97%–99,99%. Je 100 Klone wurden auf einer Agarplatte in großen Ausstrichen kultiviert und danach die Plasmide als Pool präpariert. Die Genbank bestand dementsprechend aus 36 Plasmidpools.

2. Selektion des icl-tragenden Genbankfragments

Mit den Plasmidpräparationen der Genbank wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ICL1d *ura3*(fs) (E. Fernandez et al., 1992, *Eur. J. Biochem.* 204: 983–990) transformiert. Diese Mutante ist im ICL1-Gen disruptiert und besitzt im *ura3*-Gen eine Mutation im Leserahmen. Dieser Genotyp führt dazu, daß der Stamm nicht auf Ethanol als Kohlenstoffquelle wachsen kann und eine Uracil-Auxotrophie zeigt. Im ersten Schritt wurden die mit der Genbank transformierten Hefezellen auf Minimalmedium mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle selektioniert. Aufgrund des auf dem Plasmid vorhandenen *ura3*-Gens konnten nur die Zellen wachsen, die ein Plasmid aufgenommen hatten, denn das Minimalmedium enthielt kein Uracil. In diesem Schritt wurden 1900 Klone erhalten. Diese wurden durch Replikaplattierung auf ein Minimalmedium mit Ethanol als einziger Kohlenstoffquelle übertragen. Da zum Wachstum auf Ethanol unbedingt die Isocitratlyase als anaplerotisches Enzym nötig ist, konnten nur die Klone wachsen, die auf dem Plasmid das ICL-Gen trugen. Es konnten zwei Klone isoliert werden, die auf Ethanol wuchsen.

3. Evidenzen für die Funktionalität des isolierten Genbankfragments

Zur Überprüfung, ob die Komplementation des chromosomalen ICL-Defekts plasmid-kodiert war, wurden die selektionierten *Saccharomyces*-Klone zweimal auf Vollmedium mit Uracil kultiviert und die erhaltenen Zellen auf Platten vereinzelt. Von 16 bzw. 13 zufällig ausgewählten Klonen wuchsen 7 bzw. 5 nicht mehr auf

Minimalmedium mit Glucose. Genau diese Klone wuchsen auch nicht mehr auf Minimalmedium mit Ethanol. Die Kurierung vom Plasmid war also mit dem Verlust der ICL1d-Komplementation korreliert.

Aus einem der beiden Klone wurde das Plasmid wieder isoliert. Es enthielt ein Insert von etwa 8 kb. Erneute Transformation der *Saccharomyces*- Mutante führte zur Komplementation aller gefundenen Klone. Das 8 kb-Fragment ließ sich durch Sph I auf 2,9 kb, die voll funktionell waren, verkürzen.

Im Rohextrakt der auf Ethanol gewachsenen Transformante war die Isocitratlyase mit einer spezifischen Aktivität von 0,3 U/mg Protein meßbar. Zudem zeigte der Westernblott mit polyklonalen Antikörpern gegen die Ashbya-ICL ein deutliches Signal.

PCR mit von tryptischen Peptiden der ICL abgeleiteten Primern ergab starke Signale der erwarteten Größe. Aus einem zweidimensionalen Elektrophoresegel war ein Protein isoliert, mit Trypsin in Peptide zerlegt und durch Edmannabbau ansequenziert worden. Der Vergleich der Peptidsequenzen mit Datenbanken ergab eine Identität von über 70% mit der Isocitratlyase aus *Saccharomyces cerevisiae*. Davon abgeleitete Primer wurden zur PCR eingesetzt. Von dem ca. 8 kb großen komplementierenden Genbankfragment wurden 3,3 kb sequenziert (Sanger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463—5467). Auf der ermittelten Sequenz konnten durch Datenbankvergleich zwei kodierende Bereiche gefunden werden. Ein Leserahmen von 1680 Basen (Tabelle 1) zeigt eine 65%ige Identität zum ICL1-Gen von *Saccharomyces cerevisiae*. Das ICL-Gen liegt 375 Basen upstream von einer Sequenz die 84% Identität zu einer Ser-tRNA von *Saccharomyces cerevisiae* zeigt (Tabelle 1).

4. Funktionalität subklonierter ICL in einem *E.coli*/f1efle/Ashbya-Shuttlevektor

Zwei durch Restriktionsverdau erhaltene Fragmente und ein PCR-Produkt des isolierten Genbankfragments (Fig. 2) wurden in das von Steiner und Philippsen (1994, Mol. Gen. Genet 242: 263—271) konstruierte Plasmid pAG 100 (Fig. 3) kloniert. Bei den Fragmenten handelte es sich um ein 2,9 kb Sph I-Fragment (pAG 100 icl4) und um ein 2,2 kb Bgl I/Eco RV-Fragment (pAG 100 icl6). Beide Fragmente enthielten die Ser-tRNA. Deshalb wurde zusätzlich eine PCR-Amplifikation des putativen Gens mit daran fusionierten Bam HI-Schnittstellen (pAG 100 icl8) durchgeführt. Alle drei DNAs wurden in die Bam HI site des Plasmids pAG 100 kloniert. Mit den erhaltenen Plasmiden wurde die Hefemutante *Saccharomyces cerevisiae* ICL1d ura3 (fs) transformiert. Alle drei Konstrukte führten zur vollständigen Komplementation der ICL1-Disruption d. h. trugen funktionelle Gene.

5. Wirkung der ICL tragenden Plasmide auf die Riboflavinbildung von *Ashbya gossypii*

Die Transformation von *Ashbya gossypii* (Methode: Wright und Philippsen, 1991) Gene 109: 99—105) mit den oben erklärten Plasmiden führte zu signifikanten Erhöhungen der Riboflavinbildung. Kultiviert wurde in 500 ml Schüttelkolben mit zwei Schikanen, das 50 ml Medium aus 10 g/l Sojaöl, 10 g/l Hefeextrakt und 200 µg/ml Geneticin enthielt. Der Kontrollstamm *A.gossypii* pAG 100, der ein Plasmid ohne Insert enthielt, produzierte in zwei Tagen $18,7 \pm 0,1$ mg/l Riboflavin. Die Stämme *A. gossypii* pAG 100.4 und *A.gossypii* pAG 100.6 produzierten $31,2 \pm 6,1$ mg/l bzw. $31,0 \pm 2,0$ mg/l Riboflavin (Fig. 4). Eine signifikante Änderung der spezifischen Aktivität der Isocitratlyase war aufgrund der starken Streuung nicht meßbar. Der Stamm *A. gossypii* pAG 100.8 produzierte in einem Medium, das noch durch 3 g/l Glycin supplementiert wurde, innerhalb von drei Tagen $65 \pm 5,6$ mg/l Riboflavin. Der Kontrollstamm *A.gossypii* pAG 100 bildete dagegen im direkten Vergleich nur $29,9 \pm 1,8$ mg/l Riboflavin (Fig. 5). Weder in der spezifischen Aktivität der Isocitratlyase noch im Myzeltrockengewicht waren signifikante Unterschiede meßbar.

Tabelle 1

CGAAAGCGCC	AAATACCGGA	AACGGCACAG	GCGCAGCTCT	AATAGCCGTT	-501	
CCACGATAAC	TTTGGACAGT	TATGGCACTA	TGGCCGAGTG	GTTAAGGCGA	-451	5
Ser-tRNA						
AGACTTGAAA	TCTGTTGGGC	TCTGCCCGCG	CTGGTTCAAA	TCCTGCTGGT	-401	
GTCGTTATTT	TGCGCGTTTC	TTTTTAGATG	AAACTCAGGG	GCCTTTAGTC	-351	10
CGCCCTTTTG	CCCGCTGATT	CATOGCCCGC	CAGCAACACC	GGTTGAGCCG	-301	15
ATCAGCGCAA	GAACGCGCAA	AGTCACGTAT	GGCCCCTAAG	AGTTGAGCTC	-251	
TCCCCCTCGG	CTCCTTCGGG	GCGCGGAAAA	GCCTGCGTCA	CCCCATTAAG	-201	
TCCGAAACCG	CGTTCAAGTG	TACTTGGTCC	GGGCCAATGT	GGTTGCCTCA	-151	20
TCCGAGTCAC	CGATACGCAG	GTGCGCCCGT	CGAGTCACCA	TTAGGAGTAG	-101	
AGCATCTGAT	TATATATAGG	CCTAGTTACA	GCGGTAAACAT	AGACTGATAG	-51	25
CTCCAGCTCC	AGCACTAGCT	TGTAGGACAT	CTGCGCGACA	CCCACTGAAC	-1	
ATG TCC CCT TCC GTC AGA GAC GCC CGC AAC GAC CTT GCC AGC CTG					45	
Met Ser Pro Ser Val Arg Asp Ala Arg Asn Asp Leu Ala Ser Leu						30
1 5 10 15						
CAA CAG CAG GCA GCC GGC GAA GCC GAG GAT ATT AGG AGA TGG TGG					90	
Gln Gln Gln Ala Ala Ala Gln Ala Gln Asp Ile Arg Arg Trp Trp						35
16 20 25 30						
AGC CAG CCA CGG TGG GCG GGC ACC AAG CGC GTG TAC ACG GCC GAG					135	
Ser Gln Pro Arg Trp Ala Gly Thr Lys Arg Val Tyr Thr Ala Glu						40
31 35 40 45						
GAC ATC GTC AAG CGC CGC GGC ACG TTC CCT GTC GTC GAA TAC CCA					180	
Asp Ile Val Lys Arg Arg Gly Thr Phe Pro Val Val Glu Tyr Pro						45
46 50 55 60						
TCT TCC GTA ATG GCG GAC AAG CTC GTG GAG ACA TTG GCG CGG CAC					225	
Ser Ser Val Met Ala Asp Lys Leu Val Glu Thr Leu Ala Arg His						50
61 65 70 75						
TCG CGC AAC GGC ACG GTT TCA CAG ACG TTC GGA GTG CTC GAC CCA					270	
Ser Arg Asn Gly Thr Val Ser Gln Thr Phe Gly Val Leu Asp Pro						55
76 80 85 90						
GTG CAA ATG ACG CAA ATG GTG AAG TAT CTG GAC ACG ATT TAC GTG					315	
Val Gln Met Thr Gln Met Val Lys Tyr Leu Asp Thr Ile Tyr Val						60
91 95 100 105						
TCT GGC TGG CAA TGC AGC GCC ACG GCT TCG ACC TCG AAC GAG CCT					360	
Ser Gly Trp Gln Cys Ser Ala Thr Ala Ser Thr Ser Asn Glu Pro						65
106 110 115 120						

	GGG	CCC	GAT	CTC	GCG	GAC	TAT	CCG	ATG	GAC	ACC	GTG	CCA	AAC	AAG	405
	Gly	Pro	Asp	Leu	Ala	Asp	Tyr	Pro	Met	Asp	Thr	Val	Pro	Asn	Lys	
	121				125					130					135	
5	GTC	GAG	CAC	CTG	TTC	ATG	GCG	CAG	CTG	TTC	CAC	GAC	CGG	AAA	CAG	450
	Val	Glu	His	Leu	Phe	Met	Ala	Gln	Leu	Phe	His	Asp	Arg	Lys	Gln	
	136				140					145					150	
10	CGC	GAG	GCC	CGC	CTG	TCG	TGC	ACT	ACC	CAG	CGC	GAG	CTC	GAC	CAA	495
	Arg	Glu	Ala	Arg	Leu	Ser	Cys	Thr	Thr	Gln	Arg	Glu	Leu	Asp	Gln	
	151				155					160					165	
15	TTG	GGG	CCT	GAG	ATT	GAC	TAC	TTG	AGG	CCG	ATT	GTG	GCT	GAC	GCA	540
	Leu	Gly	Pro	Glu	Ile	Asp	Tyr	Leu	Arg	Pro	Ile	Val	Ala	Asp	Ala	
	166				170					175					180	
20	GAC	ACC	GGC	CAC	GGC	GGG	CTA	ACA	GCC	GTG	TTT	AAA	CTC	ACG	AAG	585
	Asp	Thr	Gly	His	Gly	Gly	Leu	Thr	Ala	Val	Phe	Lys	Leu	Thr	Lys	
	181				185					190					195	
25	ATG	TTC	ATC	GAG	CGC	GGT	GCA	GCC	GGT	ATC	CAC	ATG	GAG	GAC	CAG	630
	Met	Phe	Ile	Glu	Arg	Gly	Ala	Ala	Gly	Ile	His	Met	Glu	Asp	Gln	
	196				200					205					210	
30	TCC	TCC	AGC	AAC	AAA	AAG	TGC	GGG	CAC	ATG	GCG	GGC	CGC	TGC	GTG	675
	Ser	Ser	Ser	Asn	Lys	Lys	Cys	Gly	His	Met	Ala	Gly	Arg	Cys	Val	
	211				215					220					225	
35	ATC	CCT	GTT	CAG	GAG	CAC	ATT	AGT	CGT	TTA	GTG	ACT	GTG	CGC	ATG	720
	Ile	Pro	Val	Gln	Glu	His	Ile	Ser	Arg	Leu	Val	Thr	Val	Arg	Met	
	226				230					235					240	
40	TGT	GCG	GAC	GTG	ATG	CAC	TCG	AAC	CTG	GTG	CTT	GTG	GCG	AGA	ACA	765
	Cys	Ala	Asp	Val	Met	His	Ser	Asn	Leu	Val	Leu	Val	Ala	Arg	Thr	
	241				245					250					255	
45	GAC	TCG	GAG	GCC	GCC	ACC	TTA	CTT	AGC	TCG	AAC	ATT	GAC	GCG	CGC	810
	Asp	Ser	Glu	Ala	Ala	Thr	Leu	Leu	Ser	Ser	Asn	Ile	Asp	Ala	Arg	
	256				260					265					270	
50	GAT	CAT	TAC	TAC	ATT	GTG	GGG	GCC	TCG	AAC	CCT	GAG	GTA	ACT	GTA	855
	Asp	His	Tyr	Tyr	Ile	Val	Gly	Ala	Ser	Asn	Pro	Glu	Val	Thr	Val	
	271				275					280					285	
55	CCG	CTG	ATC	GAA	GTT	TTG	GAC	GCC	GCG	CAG	CAG	GCC	GGC	GCC	TCA	900
	Pro	Leu	Ile	Glu	Val	Leu	Asp	Ala	Ala	Gln	Gln	Ala	Gly	Ala	Ser	
	286				290					295					300	
60	GGT	GAC	AGA	TTG	GCT	CAG	CTA	GAG	GAG	GAC	TGG	TGC	AAG	AAG	GCC	945
	Gly	Asp	Arg	Leu	Ala	Gln	Leu	Glu	Glu	Asp	Trp	Cys	Lys	Lys	Ala	
	301				305					310					315	
65	AAG	TTG	AGG	CTC	TTC	CAC	GAG	GCA	TTT	GCC	GAC	CAG	GTG	AAT	GCC	990
	Lys	Leu	Arg	Leu	Phe	His	Glu	Ala	Phe	Ala	Asp	Gln	Val	Asn	Ala	
	316				320					325					330	
70	AGC	CCT	TCG	ATC	AAA	GAC	AAG	GCG	GGC	GTT	ATT	GCC	AAA	TTT	AAC	1035
	Ser	Pro	Ser	Ile	Lys	Asp	Lys	Ala	Gly	Val	Ile	Ala	Lys	Phe	Asn	
	331				335					340					345	

DE 195 45 468 A1

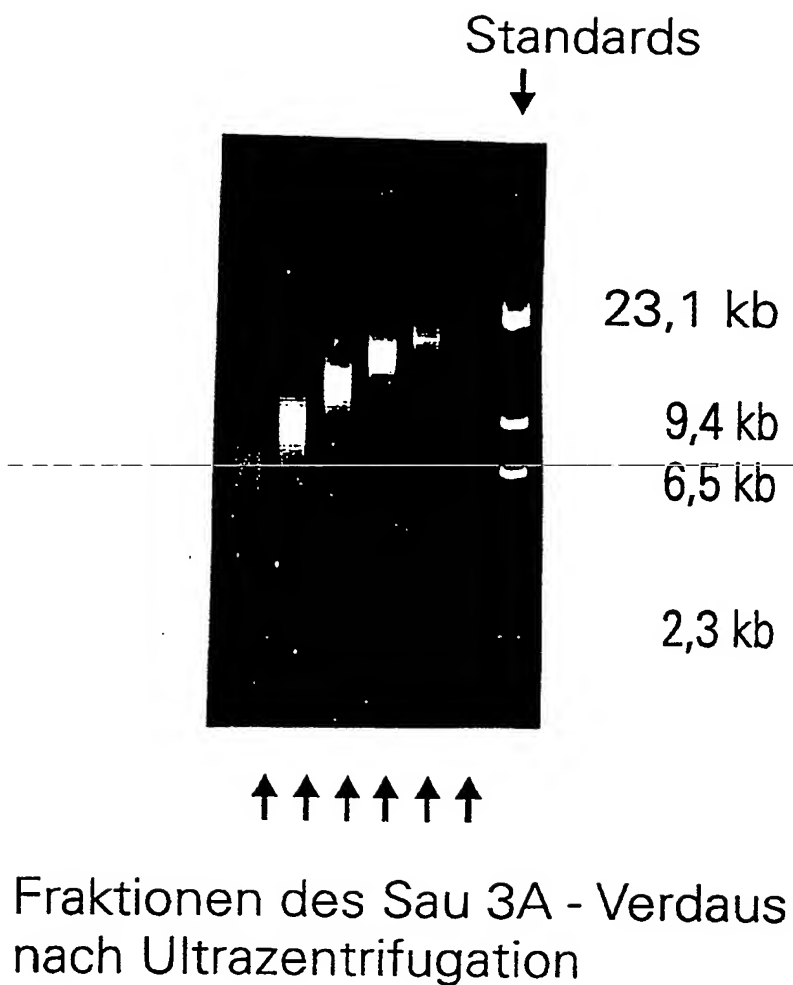
TCA Ser 346	CAG Gln	ATC Ile	GGG Gly	CCA Pro 350	CAG Gln	ACA Thr	GGC Gly	GCG Ala	TCG Ser 355	ATC Ile	AGA Arg	GAG Glu	ATG Met	CGC Arg 360	1080	
AAA Lys 361	CTG Leu	GGC Gly	CGC Arg	GAG Glu 365	CTG Leu	CTC Leu	GGG Gly	CAG Gln	GAC Asp 370	GTC Val	TAC Tyr	TTC Phe	GAC Asp	TGG Trp 375	1125	5
GAC Asp 376	CTG Leu	CCT Pro	CGC Arg	GCT Ala 380	AGA Arg	GAG Glu	GGC Gly	TTG Leu	TAC Tyr 385	CGC Arg	TAC Tyr	AAG Lys	GGC Gly	GGC Gly 390	1170	10
ACC Thr 391	CAG Gln	TGC Cys	GCG Ala	ATC Ile 395	ATG Met	CGC Arg	GCA Ala	CGC Arg	GCG Ala 400	TTC Phe	GCG Ala	CCG Pro	TAC Tyr	GCC Ala 405	1215	15
GAC Asp 406	CTG Leu	GTC Val	TGG Trp	TTC Phe 410	GAA Glu	TCC Ser	AAC Asn	TTC Phe	CCT Pro 415	GAC Asp	TTC Phe	CAG Gln	CAG Gln	GCT Ala 420	1260	20
AAG Lys 421	GAG Gln	TTT Phe	GCG Ala	CAG Gln 425	GGC Gly	GTG Val	CGC Arg	GAG Glu	AAG Lys 430	TTC Phe	CCC Pro	AAC Asn	AAG Lys	TGG Trp 435	1305	
ATG Met 436	GCC Ala	TAC Tyr	AAC Asn	TTG Leu 440	TCG Ser	CCC Pro	AGC Ser	TTC Phe	AAC Asn 445	TGG Trp	CCG Pro	AAG Lys	GCC Ala	ATG Met 450	1350	25
CCT Pro 451	CCC Pro	AAG Lys	GAG Glu	CAG Gln 455	GAG Glu	AAC Asn	TAC Tyr	ATC Ile	CAA Gln 460	CGG Arg	CTG Leu	GGC Gly	GAG Glu	ATC Ile 465	1395	30
GGA Gly 466	TAT Tyr	GTG Val	TGG Trp	CAG Gln 470	TTC Phe	ATC Ile	ACG Thr	CTA Leu	GCC Ala 475	GGC Gly	CTG Leu	CAT His	ACC Thr	AAT Asn 480	1440	35
GCC Ala 481	TTG Leu	GCC Ala	ATC Ile	GAC Asp 485	AAC Asn	TTC Phe	TCG Ser	CGC Arg	GAA Glu 490	TTC Phe	AGC Ser	AGG Arg	TTC Phe	GGA Gly 495	1485	40
ATG Met 496	CGT Arg	GCG Ala	TAT Tyr	GCA Ala 500	CAA Gln	GGC Gly	ATC Ile	CAG Gln	CAG Gln 505	AGG Arg	GAG Glu	ATG Met	GAC Asp	GAG Glu 510	1530	
GGC Gly 511	GTC Val	GAT Asp	GTC Val	CTA Leu 515	AAA Lys	CAC His	CAG Gln	AAG Lys	TGG Trp 520	GCC Ala	GGC Gly	GCA Ala	GAG Glu	TAT Tyr 525	1575	45
GTT Val 526	GAC Asp	AGC Ser	ATT Ile	CTC Leu 530	AAG Lys	CTT Leu	GCC Ala	CAG Gln	GGC Gly 535	GGT Gly	GTG Val	TCT Ser	TCG Ser	ACA Thr 540	1620	50
GCC Ala 541	TCG Ser	ATG Met	GGT Gly	AAG Lys 545	GGT Gly	GTA Val	ACC Thr	GAA Gln	GAG Glu 550	CAG Gln	TTC Phe	GGC Gly	TCC Ser	TCA Ser 555	1665	55
AAC Asn 556	GGT Gly	GCC Ala	AAA Lys	CTA Leu 560	TGA	TAT	CAT	CTC	TGA	GTC	ATT	TCT	CTC	GAC	1710	60
AAGATCCTCG	GCCAGACTTC	TGGAATATAT	ATAACATCGG	GTACCCCGACAT											1760	
CCCTGCCTTC	CGCAACGTGC	GAAGCAGCTG	ATACGTATAC	TTTAAACGCACA											1840	65

Patentansprüche

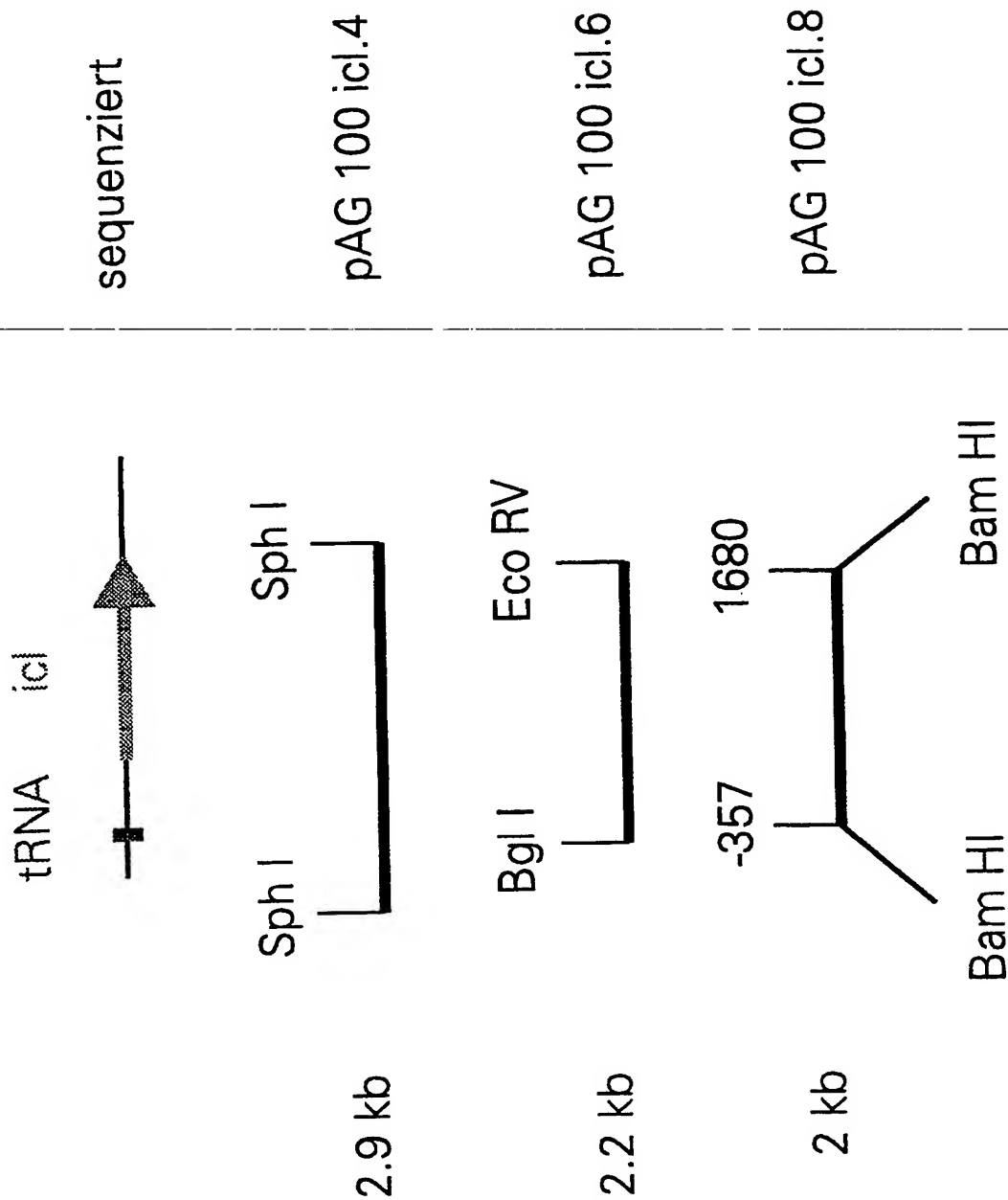
1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Riboflavin, bei dem die Isocitratlyase-(ICL-)Aktivität und/oder die ICL-Genexpression eines Riboflavin-produzierenden Mikroorganismus erhöht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die endogene ICL-Aktivität des Mikroorganismus erhöht wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß durch Mutation des endogenen ICL-Gens ein Enzym mit höherer ICL-Aktivität erzeugt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die ICL-Genexpression durch Erhöhen der ICL-Genkopienzahl erhöht wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erhöhung der Genkopienzahl das ICL-Gen in ein Genkonstrukt eingebaut wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das ICL-Gen in ein Genkonstrukt eingebaut wird, das dem ICL-Gen zugeordnete regulatorische Gensequenzen enthält.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß ein Riboflavin-produzierender Mikroorganismus mit dem das ICL-Gen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß *Ashbya gossypii* mit dem das ICL-Gen enthaltenden Genkonstrukt transformiert wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das ICL-Gen aus einem Mikroorganismus isoliert wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das ICL-Gen aus *Ashbya gossypii* isoliert wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die ICL-Genexpression durch Verstärkung der Transkriptionssignale erhöht wird.
12. ICL-Gen mit einer für die in Tabelle 1 angegebene Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen kodierenden Nukleotid-Sequenz.
13. ICL-Gen nach Anspruch 12 mit der Nukleotidsequenz von Nucleotid 1 bis 1680 gemäß Tabelle 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz.
14. ICL-Gen nach Anspruch 12 oder 13 mit einem vorgeschalteten Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid -375 bis -1 gemäß Tabelle 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz.
15. ICL-Gen nach einem der Ansprüche 12 bis 14 mit diesem zugeordneten regulatorischen Gensequenzen.
16. Genstruktur, enthaltend ein ICL-Gen nach einem der Ansprüche 12 bis 15.
17. Vektor, enthaltend ein ICL-Gen nach einem der Ansprüche 12 bis 15 oder eine Genstruktur nach Anspruch 16.
18. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form ein ICL-Gen nach einem der Ansprüche 12 bis 15 oder eine Genstruktur nach Anspruch 16.
19. Transformierte Zelle nach Anspruch 18, enthaltend einen Vektor nach Anspruch 17.
20. Transformierte Zelle nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie *Ashbya gossypii* ist.
21. Verwendung eines ICL-Gens zur Steigerung der Riboflavinproduktion von Mikroorganismen.
22. Verwendung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß ein mutiertes ICL-Gen, das für ein Enzym mit erhöhter ICL-Aktivität kodiert, verwendet wird.
23. Verwendung nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß der Riboflavin-produzierende Mikroorganismus mit einem Genkonstrukt, das ein ICL-Gen enthält, transformiert wird.
24. Verwendung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß das Genkonstrukt zusätzlich regulatorische Gensequenzen trägt.
25. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß ein mikrobielles ICL-Gen verwendet wird.
26. Verwendung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß ein ICL-Gen aus *Ashbya gossypii* verwendet wird.
27. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß als Riboflavin-produzierender Mikroorganismus *Ashbya gossypii* verwendet wird.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

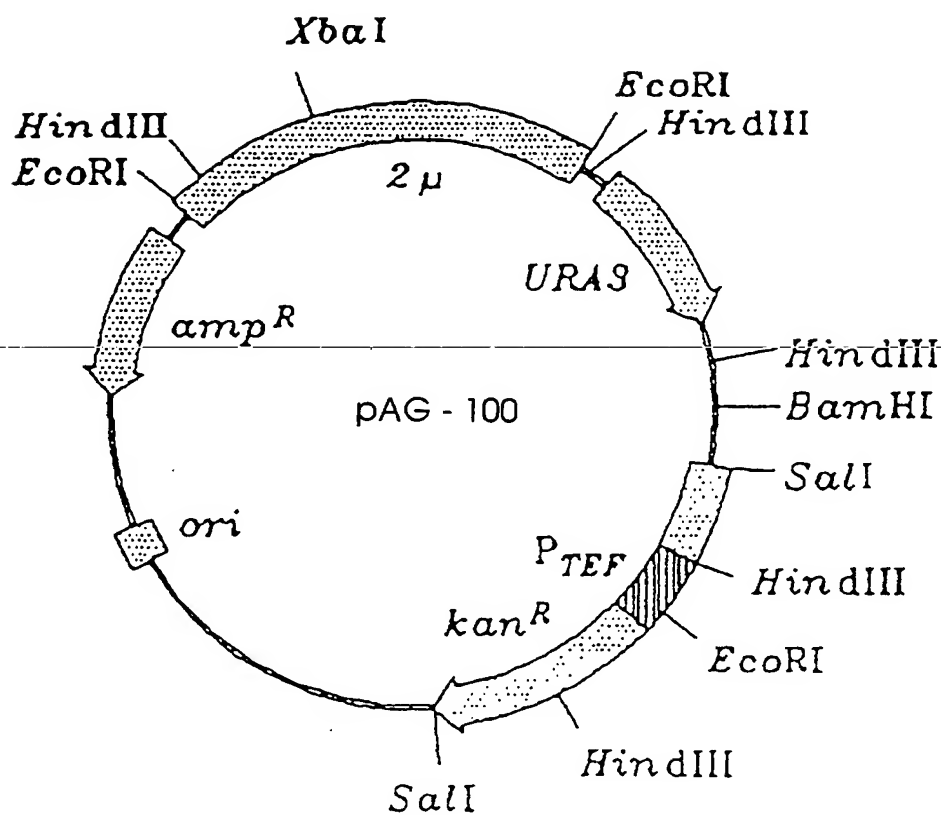
- Leerseite -



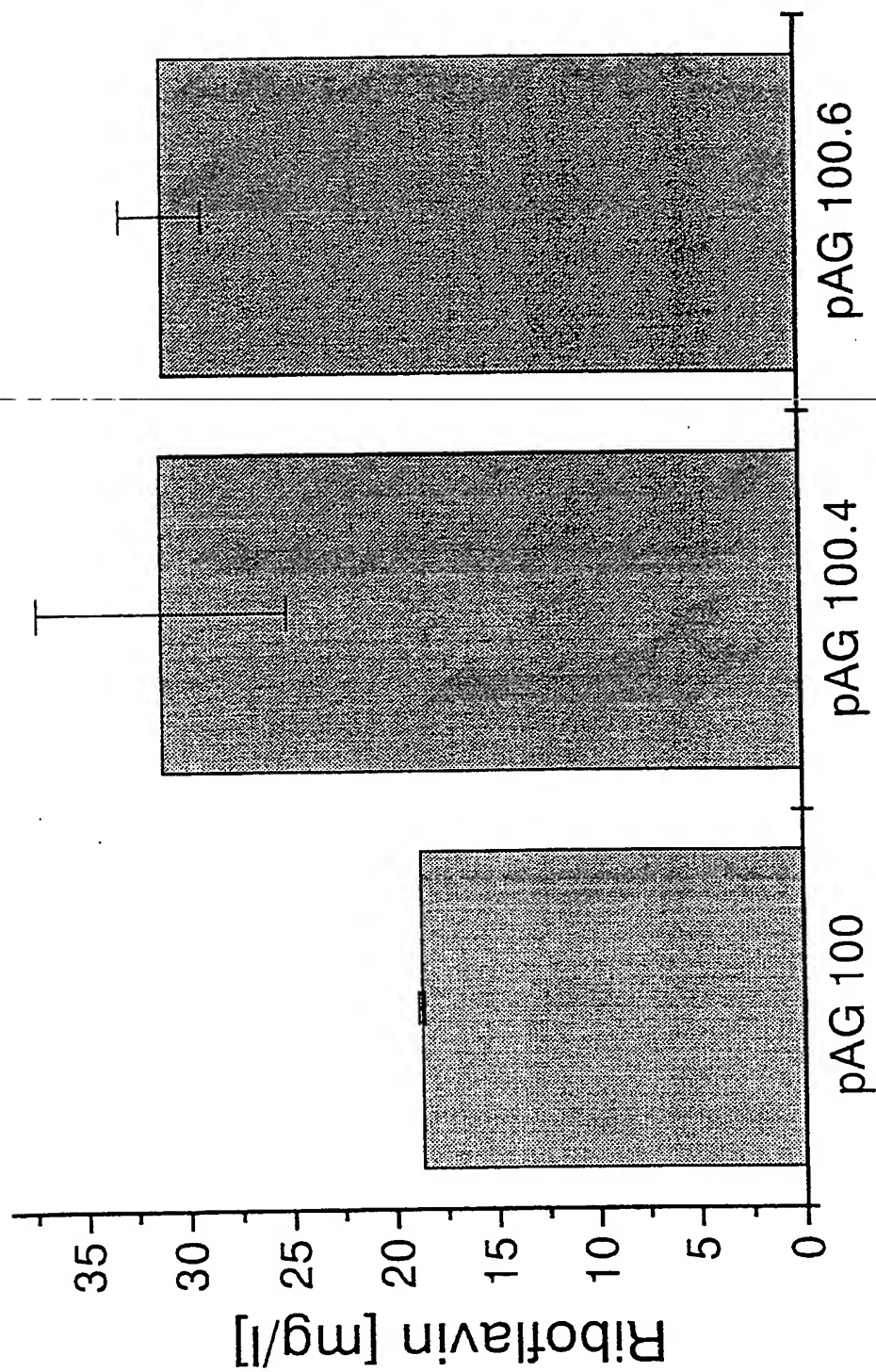
Figur 1



Figur 2



Figur 3



Figur 4

Stamm

Figur 5

